

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 7 月 22 日 (22.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/060919 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 16/28, C12N 15/09, C12P
21/08, A61K 39/395, A61P 31/12, 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015230

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 28 日 (28.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-377078
2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小嶋 哲郎 (KOJIMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 妹尾 千明 (SENOO, Chiaki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 名取 修 (NATORI, Osamu) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 糟谷 恵子 (KASUTANI, Keiko) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka

(JP). 石井 慎也 (ISHII, Shinya) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市御町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGONIST ANTIBODY AGAINST HETERORECEPTOR

(54) 発明の名称: ヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体

(57) Abstract: An animal is immunized with the A chain and the B chain of a receptor and then mRNA is extracted from spleen cells of this animal. Next, the L-chain and H-chain variable regions are collected by RT-PCR with the use of primers corresponding to the variable regions including CDR. Single-strand Fv is synthesized by assembly PCR and thus a phage library is constructed. Next, antigen-binding antibody clones are concentrated and cloned by panning. The single-strand variable region is inserted between a signal sequence for animal cells and CH1-hinge-CH2-CH3 to prepare an scFv-CH1-Fc expression vector. By transferring various combinations of the vector into cells, antibodies are expressed and an antibody clone showing a ligand-like activity is selected.

(57) 要約: 動物に受容体の A 鎖、B 鎖それぞれを免疫した後、この動物の脾細胞から mRNA を抽出し、CDR を含む可変領域に対応するプライマーを用いて RT-PCR にて L 鎖、H 鎖の可変領域を回収した。assembly PCR にて一本鎖 Fv を合成し、ファージライブラリーを構築した。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域を動物細胞用のシグナル配列と CH1-hinge-CH2-CH3 の間に挿入し、scFv-CH1-Fc 発現ベクターを作製した。様々な組み合わせで細胞に導入、抗体を発現させ、リガンド同様の活性を示す抗体クローンを選択した。

WO 2004/060919 A1

- 1 -

明細書

ヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体

5 技術分野

本発明は、ヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体、および該抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

背景技術

10 抗体は血中での安定性が高く、抗原性もないことから医薬品として注目されている。その中でも二種類の抗原を同時に認識できる二種特異性抗体が提唱されて久しいが、現状では二種類の抗原を単に繋ぐのみである。しかし抗体は抗原中の特定のエピトープに結合するため、適当な抗体の組み合わせを選べば二種特異性抗体によって2つの抗原を望む距離・角度に配位することが出来ると考えられる。

15 多くのサイトカイン受容体はリガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝え得るようになると考えられている。つまり適切な抗受容体抗体はリガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となりうる。既にホモ二量体から成るMPL（米国特許出願公開第98/17364号明細書、および文献（「Blood」、1998年、Vol. 92、No. 6、
20 p. 1981-1988）参照）、EP0受容体、GH受容体に対してアゴニスト作用を示すモノクローナル抗体が報告されている。

しかしながら、ヘテロ二量体を形成する受容体の場合は、二種の受容体鎖の複合体を形成させる必要があるため一般的な抗体ではアゴニスト作用を期待できない。この目的には二種類の抗原を二本の腕でそれぞれ認識出来る上記の二種特異性抗体が適すると考えられるが、報告例は未だなかった。
25

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究を行った。アゴニスト抗体のスクリーニングでは、受容体を構成する二種の鎖 (A, B) それぞれに対する抗体 (α , β) を多数選択し、 α 、 β の組み合わせについてひとつひとつ検定を行う必要がある。また二種特異性抗体の産生には、抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは抗体の発現ベクターを細胞へ導入しなければならない。本発明者らは、例えば、以下のような方法によって、ヘテロ鎖からなる受容体に対してアゴニスト作用を有する二種特異性抗体を作製することに成功した。より具体的には、以下のように行った。

動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫した。この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) を含む可変領域に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収した。assembly PCRにて一本鎖Fv (scFv) を合成し、ファージライブラリーを構築した。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域 (scFv) を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製した。様々な組み合わせで細胞に導入、抗体を発現させた。この培養上清を目的のリガンドに反応する細胞に添加し、リガンド同様の活性を示す抗体クローンを選択した。

上記方法により、AR1, AR2の二種の鎖から成るI型インターフェロン受容体に対するアゴニスト抗体の分離に成功した。即ち本発明者らは、ヘテロ鎖からなる受容体に対してアゴニスト作用を有する二種特異性抗体を初めて分離することに成功し、本発明を完成させた。

本発明は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体に関し、より具体的には、

- 3 -

- [1] ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体、
- [2] 受容体がサイトカイン受容体である [1] に記載の抗体、
- [3] サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である [2] に記載の抗体、
- [4] インターフェロン受容体がI型インターフェロン受容体である [3] に記載
- 5 の抗体、
- [5] I型インターフェロン受容体がAR1鎖及びAR2鎖を含んでいることを特徴とする [4] に記載の抗体、
- [6] 受容体が多量体である [1] に記載の抗体、
- [7] 多量体が二量体である [6] に記載の抗体、
- 10 [8] 二種特異性抗体である [1] ~ [7] のいずれかに記載の抗体、
- [9] 抗AR1鎖抗体の可変領域と、抗AR2鎖抗体の可変領域とを含む、[5] に記載の抗体、
- [10] 抗AR1鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記 (b1) ~ (b10) のいずれかに記載のアミノ
- 15 酸配列からなる可変領域とを含む、[9] に記載の抗体、
- (a) H鎖可変領域が配列番号：1 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2 に記載のアミノ酸配列
- (b1) H鎖可変領域が配列番号：7 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：8 に記載のアミノ酸配列
- 20 (b2) H鎖可変領域が配列番号：9 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10 に記載のアミノ酸配列
- (b3) H鎖可変領域が配列番号：19 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：20 に記載のアミノ酸配列
- (b4) H鎖可変領域が配列番号：13 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変
- 25 領域が配列番号：14 に記載のアミノ酸配列
- (b5) H鎖可変領域が配列番号：23 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変

- 4 -

領域が配列番号：24に記載のアミノ酸配列

(b6) H鎖可変領域が配列番号：5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：6に記載のアミノ酸配列

(b7) H鎖可変領域が配列番号：17に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：18に記載のアミノ酸配列

(b8) H鎖可変領域が配列番号：15に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：16に記載のアミノ酸配列

(b9) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列

(b10) H鎖可変領域が配列番号：11に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：12に記載のアミノ酸配列

[11] 抗AR1鎖抗体における下記(a)のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記(b1)～(b3)のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、[9]に記載の抗体、

(a) H鎖可変領域が配列番号：3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：4に記載のアミノ酸配列

(b1) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列

(b2) H鎖可変領域が配列番号：25に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：26に記載のアミノ酸配列

(b3) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列

[12] [1]～[11]のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬組成物、を提供するものである。

本発明は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体を提供する。

本発明においてヘテロ鎖を含む受容体とは、受容体（多量体）が異なる2つ以上のタンパク質（受容体鎖）で構成されていることをいう。多量体は二量体、三量体、四量体など、そのタンパク質（受容体鎖）数により限定はされないが、好ましくは二量体である。例えば、受容体が二量体の場合には、ヘテロ受容体は2つの構成タンパク質（受容体鎖）が同一でないことを表す。

アゴニスト活性を有する抗体とは、ある受容体に対して、アゴニスト作用を有する抗体を指す。一般的に、アゴニストであるリガンド（因子）が受容体と結合すると、受容体タンパク質の立体構造が変化し、受容体が活性化（受容体が膜タンパク質である場合には、通常、細胞増殖などのシグナルを発する）される。二量体を形成するタイプの受容体である場合には、アゴニスト抗体は適切な距離、角度で受容体を二量体化させることにより、リガンドと同様の働きをすることができる。つまり、適当な抗受容体抗体はリガンドにより受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となり得る。

アゴニスト作用によって変化が誘導される生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、蛋白質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性、細胞死誘導活性、アポトーシス誘導活性、などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

本発明の好ましい態様においては、本発明の受容体としてサイトカイン受容体を挙げることができる。サイトカインは、通常、各種の血球細胞の増殖と分化を制御する生理活性タンパク質の総称として用いられるが、非免疫系細胞を含む細胞の増殖因子及び増殖抑制因子を指すこともある。従って、サイトカインは細胞から放出され、免疫、炎症反応の制御作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化の調節作用など細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子の総称である。

サイトカインの具体的な例としては、インターロイキン1～15、コロニー刺

激因子 (G-CSF、M-CSF、GM-CSFなど)、インターフェロン (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、など)、ケモカイン、腫瘍壊死因子 (TNF)、リンボトキシン、エリスロポエチン、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子などを挙げることができるが、好ましくはインターフェロンであり、特に好ましくはI型インターフェロンである。

- 5 サイトカイン受容体の具体的な例として、インターフェロン受容体ファミリー (IFN- α 受容体、IFN- β 受容体、IFN- γ 受容体、IL-10受容体、など)、インターロイキン受容体ファミリー (IL-2受容体、IL-3受容体、IL-6受容体、GM-CSF受容体、など)、セリントレオニンキナーゼ型受容体ファミリー (BMP受容体、TGF- β 受容体、アクチビン受容体、など)、チロシンキナーゼ型受容体 (EGF受容体、
10 PDGF受容体、VEGF受容体、c-kit受容体、c-fms受容体、など)、免疫グロブリン受容体ファミリー (IL-1受容体、など)、細胞死受容体ファミリー (TNF受容体、Fas受容体、NGF受容体、など)、7回膜貫通型受容体ファミリー (IL-8受容体、ケモカイン受容体、など)などを挙げることができるが、好ましくはインターフェロン受容体ファミリーであり、さらに好ましくはI型インターフェロン受容体
15 である。

インターフェロンにはIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- τ などが含まれる。IFN- α とIFN- β は相同性が高い為、これら2つのIFNは同一のレセプターを介して反応することができる。又、インターフェロン α とインターフェロン β はI型インターフェロンに分類される。

- 20 I型インターフェロン受容体の好ましい例として、AR1鎖 (GenBank ACCESSION No : J03171、文献: Uze G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon [[alpha]] receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. Cell (1990) 60, 225-234.) およびAR2鎖 (GenBank ACCESSION No : U29584、文献: Domanski P, Witte M, Kellum M,
25 Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, et al. Cloning and expression of a long form of the [[beta]] subunit of the interferon [[alpha]]/[[beta]])

receptor that is required for signalling. J Biol Chem (1995) 270, 21606-21611. ; Lutfu G, Holland SJ, Cinato E, Monneron -D., Reboul J, Rogers NC, et al. Mutant U5A cells are complemented by an interferon- α receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. EMBO J (1995) 14, 5100-5108.) を有する受容体を挙げるることができる。

多種特異性抗体とは、異なる多種の抗原と特異的に結合し得る抗体を言う。つまり、多種特異性抗体は少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する抗体である（例えば、抗原がヘテロ受容体の場合には、多種特異性抗体はヘテロ受容体を構成する異なるドメインを認識する）。通常、このような分子は2個の抗原と結合するものであるが（二種特異性抗体：bispecific抗体）、それ以上の（例えば、3種類の）抗原に対して特異性を有していてもよい。

本発明のヘテロ受容体に対する抗体は、特に制限されないが、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体であることが好ましい。（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

さらに、本発明の抗体は、その抗体断片や抗体修飾物、低分子化抗体などであってよい。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv等が挙げられる。ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖および軽鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである（VH-VLダイマー）。各可変領域の3つのCDRが相互作用し、VH-VLダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を

- 8 -

付与している。しかしながら、1つの可変領域（または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

また、Fab断片（F(ab)とも呼ばれる）はさらに、軽鎖の定常領域および重鎖の定常領域（CH1）を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数個の残基を付加的に有する点でFab断片と異なっている。Fab'-SHとは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'を示すものである。F(ab')断片は、F(ab')₂ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

低分子化抗体としては 一本鎖Fv（scFv）、ダイアボディ（diabody）、線状抗体、一本鎖抗体分子などが含まれる。

ダイアボディ（diabody; Db）は、遺伝子融合により構築された二価（bivalent）の抗体断片を指す（P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404, 097号、W093/11161号等）。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域（VL）及び重鎖可変領域（VH）が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖V領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原（a、b）に対するVLとVHをVL_a-VH_bとVL_b-VH_aの組合わせで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二種特異性Dbとして分泌される。

scFvまたはscFv抗体断片には、抗体のVHおよびVL領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する（Huston, J. S. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。一般に、scFvポリペプチドはさらにV_HおよびV_L領域の間にポリペプチドリンカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる（scFvの総説については、Pluckthun 『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』 Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp. 269-315, 1994) を参照)。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されない。

これら、抗体断片や低分子化抗体は、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させることによって、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体や、細胞障害性物質、エンドトキシン、放射性物質などと結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

本発明の抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、その由来は限定されない。またキメラ抗体やヒト型化抗体などの遺伝子改変抗体でもよい。

ヒト抗体の取得方法は既に知られており、例えば、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的

- 10 -

のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

遺伝子改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。

ヒト型化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。

得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

本発明のアゴニスト抗体を得る方法は特に制限されず、どのような方法で取得されてもよい。例えば、二種の鎖（A鎖、B鎖）からなるヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体を得る場合、受容体を構成する二種の鎖（A, B）それぞれで免疫動物を免疫し、複数の抗A鎖抗体及び複数の抗B鎖抗体を取得する。その後、抗A鎖抗体のH鎖とL鎖及び抗B鎖抗体のH鎖とL鎖を含む二種特異性抗体を作製する。ここで、

- 11 -

抗A鎖抗体と抗B鎖抗体はそれぞれ複数種得られているので、なるべく多くの組み合わせの二種特異性抗体を作製することが好ましい。二種特異性抗体を作製後、アゴニスト活性を有する抗体を選択する。

本発明の一つの態様においては、本発明の抗体は二種特異性抗体である。二種特性抗体の作製は、抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは抗体の発現ベクターの細胞導入などの公知の方法により行うことができる。例えば、動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫する。この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、CDRを含む可変領域に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収する。assembly PCRにて一本鎖Fv (scFv) を合成し、ファージライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域 (scFv) を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製する。抗A鎖抗体をコードするベクターと抗B鎖抗体をコードするベクターを同一の細胞に導入し、抗体を発現させることにより二種特異性抗体を得ることができる。

アゴニスト活性を有する抗体の選択は、例えば、以下のような方法により行うことができる。

- (1) 因子依存的に増殖する細胞の培養時に抗体を添加することによって、因子同様に細胞が増殖するか否かを指標とする。細胞が増殖する場合に、被験多種特異性抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定する。
- (2) 因子の本来の活性（増殖とは限らない）を示す細胞株の培養時に加えることによって、因子同様の反応を示すか否かを指標とする。因子同様の反応を示す場合に、抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定する。

上記細胞は、通常、本発明の抗体がアゴニストとして作用し得る受容体を、細胞表面において発現しており、該受容体のリガンド（例えば、アゴニスト抗体）と結合することにより、シグナルを発する。従って上記方法において使用する細胞は、受容体のリガンド（因子）依存的に増殖できる細胞（因子依存性増殖細胞）

- 12 -

胞)であることが好ましい。また、上記受容体は、通常、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発するものであることが好ましい。しかし、上記受容体が細胞増殖シグナルを出さないタイプのものである場合、該受容体を、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体と融合させ、所謂キメラ受容体とすることにより、上記方法に使用することができる。該キメラ受容体は、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。受容体と融合させることによりキメラ受容体を構築するのに適した受容体は、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体であれば特に制限されないが、通常、膜タンパク質であり、より好ましくは細胞外がリガンド受容体鎖であり細胞内が受容体鎖であるような受容体である。具体的には、G-CSF受容体、mpl、neu、GM-CSF受容体、EP0受容体、c-Kit、FLT-3等を挙げることができる。本発明における上記因子依存性増殖細胞の好適な例として、具体的には、細胞外がリガンド受容体鎖であり細胞内がG-CSF受容体鎖であるキメラ受容体を発現させた因子依存性増殖細胞BaF3を示すことができる。その他、上記方法において使用できる細胞として、例えば、NFS60、FDCP-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。

その他、アゴニスト活性を有する抗体の選択方法としては、種々の量的及び／又は質的な変化を指標とした方法が挙げられる。例えば、無細胞系 (cell free assay) の指標、細胞系 (cell-based assay) の指標、組織系の指標、生体系の指標を用いることができる。

20 無細胞系の指標としては、酵素反応やタンパク質、DNA、RNAの量的及び／又は質的な変化を用いることができる。酵素反応としては、例えば、アミノ酸転移反応、糖転移反応、脱水反応、脱水素反応、基質切断反応等を用いることができる。また、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化、二量化、多量化、分解、乖離等や、DNA、RNAの増幅、切断、伸長を用いることができる。例えばシグナル伝達経路の下流に存在するタンパク質のリン酸化を検出指標とすることができる。

細胞系の指標としては、細胞の表現型の変化、例えば、産生物質の量的及び／

- 13 -

又は質的变化、増殖活性の変化、細胞数の変化、形態の変化、特性の変化等を用いることができる。産生物質としては、分泌タンパク質、表面抗原、細胞内タンパク質、mRNA等を用いることができる。形態の変化としては、突起形成及び／又は突起の数の変化、扁平度の変化、伸長度／縦横比の変化、細胞の大きさの変化、

5 内部構造の変化、細胞集団としての異形性／均一性、細胞密度の変化等を用いることができる。これらの形態の変化は検鏡下での観察で確認することができる。特性の変化としては、足場依存性、サイトカイン依存応答性、ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の変化等を用いることができる。細胞運動性としては、細胞浸潤活性、細胞遊走活性がある。また、

10 細胞内物質の変化としては例えば、酵素活性、mRNA量、 Ca^{2+} やcAMP等の細胞内情報伝達物質、細胞内タンパク質量等を用いることができる。また、細胞膜受容体の場合には、受容体の刺激によって誘導される細胞の増殖活性の変化を指標とすることができる。

組織系の指標としては、使用する組織に応じた機能変化を検出指標とすることができる。

15 生体系の指標としては組織重量変化、血液系の変化、例えば血球細胞数の変化、タンパク質量や、酵素活性、電解質量の変化、また、循環器系の変化、例えば、血圧、心拍数の変化等を用いることができる。

これらの検出指標を測定する方法としては、特に制限はなく、吸光、発光、発色、蛍光、放射活性、蛍光偏光度、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、蛍光共鳴エネルギー移動、等を用いること

20 ができる。これらの測定方法は当業者にとっては周知であり、目的に応じて、適宜選択することができる。

例えば、吸収スペクトルは一般的に用いられるフォトメータやプレートリーダー等、発光はルミノメータ等、蛍光はフルオロメータ等で測定することができる。

25 質量は質量分析計を用いて測定することができる。放射活性は、放射線の種類に応じてガンマカウンターなどの測定機器を用いて、蛍光偏光度はBEACON（宝酒

- 14 -

造)、表面プラズモン共鳴シグナルはBIAcore、時間分解蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動などはARV0などにより測定できる。さらに、フローサイトメータなども測定に用いることができる。これらの測定方法は、一つの測定方法で2種以上の検出指標を測定しても良く、簡便であれば、2種以上の測定を同時及び/又は連続して

5 測定することによりさらに多数の検出指標を測定することも可能である。例えば、蛍光と蛍光共鳴エネルギー移動を同時にフルオロメータで測定することができる。

受容体に対する抗体は、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、免疫動物に対して抗原を免疫化することにより調製することができる。動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原(ハプテンを含む)が挙げられる。本発明においては、本発明のアゴニスト抗体がリガンドとして作用すると考えられる受容体を、上記抗原(免疫原)として使用する。本発明における上記受容体は特に制限されないが、好ましくはヘテロ二量体である。免疫化する動物として、例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫化することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回

10 投与する。このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取する。

本発明において好ましくは、免疫化された動物または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫化された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫化された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物のCDRに対応するプライマーを用い

25

- 15 -

て、RT-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。ここで、CDRとは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する3つの領域（CDR1、CDR2、CDR3）を指す。CDRに対応するプライマーとしては、例えば、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1、CL部分に対応するプライマーを用いることができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法、例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法により単離する。

免疫原とする受容体は、該受容体を構成するタンパク質全体、もしくは該タンパク質の部分ペプチドであってもよい。また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片（例えば、受容体の細胞外領域）を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然（腫瘍セルライン等）由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であってもよい。

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D,

- 16 -

POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

本発明の抗体は、例えば、AR1鎖およびAR2鎖を含むI型インターフェロン受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体である場合には、好ましくは、抗AR1鎖抗体における可変領域と、抗AR2鎖抗体における可変領域とを含む構造を有する。該

5 抗体としては、特に制限されるものではないが、例えば、抗AR1鎖抗体の下記のいずれかの可変領域と、抗AR2鎖抗体の下記のいずれかの可変領域とを含む抗体を挙げることができる。

- ・抗AR1鎖抗体の可変領域：AR1-41、AR1-24
- ・抗AR2鎖抗体の可変領域：AR2-37、AR2-11、AR2-13、AR2-45、AR2-22、AR2-43、
10 AR2-40、AR2-14、AR2-44、AR2-33、AR2-31

上記のそれぞれの可変領域のVHおよびVLのアミノ酸配列を、配列番号：1～26に示す（各可変領域のVHおよびVLと、配列番号との関係を表1に示す）。

- 17 -

表 1

可変領域	配列番号	
	VH	VL
AR1-41	1	2
AR1-24	3	4
AR2-37	5	6
AR2-11	7	8
AR2-13	9	10
AR2-45	11	12
AR2-22	13	14
AR2-43	15	16
AR2-40	17	18
AR2-14	19	20
AR2-44	21	22
AR2-33	23	24
AR2-31	25	26

抗AR1鎖抗体がAR1-24の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-13、AR2-31、あるいはAR2-44であることが好ましく、抗AR1鎖抗体がAR1-41の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-11、AR2-13、AR2-14、AR2-22、AR2-33、AR2-37、AR2-40、AR2-43、AR2-44、あるいはAR2-45であることが好ましい。AR2-13およびAR2-44は、AR1-41およびAR1-24の両方の抗体に対してパートナーとなることが可能である。上記のような対を形成する抗体もまた、本発明に含まれる。

また、本発明において、上記可変領域を含む抗体は、必ずしも可変領域の全長配列を有している必要はなく、CDR配列が保存されていれば、FR配列は抗体をヒト化等する際に適宜変更してよい。

- 18 -

従って、本発明は、上記可変領域においてCDRに対応するアミノ酸配列を有する抗体を含む。

上記可変領域の配列番号において、CDRに対応するアミノ酸番号を表2に示す。

表2

5

	配列番号		アミノ酸番号			配列番号	アミノ酸番号		
	VH		CDR1	CDR2	CDR3		CDR1	CDR2	CDR3
	AR1-41	1	31-35	50-66	99-109	2	24-34	50-56	89-97
10	AR1-24	3	31-35	50-66	99-108	4	24-34	50-56	89-97
	AR2-37	5	31-35	50-66	99-106	6	24-39	55-61	94-102
	AR2-11	7	31-35	50-66	99-108	8	24-39	55-61	94-102
	AR2-13	9	31-35	50-66	99-107	10	24-39	55-61	94-102
	AR2-45	11	31-35	50-66	99-107	12	24-39	55-61	94-102
15	AR2-22	13	31-35	50-66	99-106	14	24-39	55-61	94-102
	AR2-43	15	31-35	50-66	99-106	16	24-39	55-61	94-102
	AR2-40	17	31-35	50-66	99-106	18	24-39	55-61	94-102
	AR2-14	19	31-35	50-66	99-108	20	24-39	55-61	94-102
	AR2-44	21	31-35	50-66	99-108	22	24-39	55-61	94-102
20	AR2-33	23	31-35	50-66	99-108	24	24-39	55-61	94-102
	AR2-31	25	31-35	50-66	99-106	26	24-39	55-61	94-102

また、本発明で開示されている可変領域を用いて全長抗体を作製する場合、定常領域は特に限定されず、当業者に公知の定常領域を用いることが可能であり、

25 例えば、Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U. S.

Department of Health and Human Services. Public Health Service National

Institutes of Healthや、An efficient route to human bispecific IgG, (1998). Nature Biotechnology vol. 16, 677-681、等に記載されている定常領域を用いることができる。

本発明の抗体はアゴニスト作用を有することから、該抗体が作用する受容体の
5 活性（機能）低下に起因する疾病に対して、有効な薬剤となることが期待される。
即ち本発明は、本発明の抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。
例えば、本発明の抗体がサイトカイン受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体
である場合には、該抗体はサイトカイン様作用を有するものと考えられる。従
って該抗体は抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化調節作用を有する医
10 薬品（医薬組成物）となることが期待される。

治療または予防目的で使用される本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成
物は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、
媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定
剤、賦形剤、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有
15 機酸等）、防腐剤、界面活性剤（PEG、Tween等）、キレート剤（EDTA等）、結合剤等を
挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、
ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、
アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニ
トールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液と
20 する場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例
えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げ
られ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プ
ロピレングリコール、PEG等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80、HCO-
50）等と併用してもよい。

25 また、必要に応じて本発明の抗体をマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロー
ス、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル）に封入したり、

- 20 -

コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる

("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980) 等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗体に適用

5 し得る(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem. Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP) 第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988号)。

本発明の医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、進行の程度等を考慮して、最終的には医師の判断により適宜決定さ
10 れるものであるが、一般に大人では、1日当たり、0.1~2000mgを1~数回に分けて経口投与することができる。より好ましくは1~1000mg/日、更により好ましくは50~500mg/日、最も好ましくは100~300mg/日である。これらの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定
15 することが好ましい。

また、本発明の抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベク
20 ター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996) 参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(W093/17706等)して投与することができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路(静脈
25 内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添鼻薬等粘

- 21 -

膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。*ex vivo*においてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第4,945,050号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。

5

図面の簡単な説明

図1は、抗体のDaudi細胞に対する増殖抑制活性を示したものである。用量依存的なアゴニスト活性を確認できた。

図2は、pISRE-Luc導入K562細胞に対する抗体のISRE活性化能を示したものである。AR1-41/AR2-13のルシフェラーゼ活性測定の結果を示す。□はIFN- α 2a、●はAR1-41/AR2-13二種特異性抗体を示す。

図3は、pISRE-Luc導入K562細胞に対する抗体のISRE活性化能を示したものである。AR1-41/AR2-13のルシフェラーゼ活性測定の結果を示す。□はIFN- α 2a、●はAR1-41/AR2-14二種特異性抗体を示す。

図4は、pISRE-Luc導入K562細胞に対する抗体のISRE活性化能を示したものである。AR1-41/AR2-13のルシフェラーゼ活性測定の結果を示す。□はIFN- α 2a、●はAR1-24/AR2-13二種特異性抗体を示す。

図5は、pISRE-Luc導入K562細胞に対する抗体のISRE活性化能を示したものである。AR1-41/AR2-13のルシフェラーゼ活性測定の結果を示す。□はIFN- α 2a、●はAR1-24/AR2-31二種特異性抗体を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

25 〔実施例1〕 抗原および免疫

ヒトAR1及びAR2それぞれの細胞外領域のC末端にFLAGもしくはHis6のタグを付加

- 22 -

した可溶性受容体の発現ベクターをCHO細胞に導入し、その培養上清からアフィニティーカラムを用いて精製した。マウスプロB細胞株BaF3にヒトAR1の細胞外領域とG-CSF受容体とのキメラ分子の発現ベクターを導入し、高発現細胞を樹立した。同様にヒトAR2の細胞外領域とG-CSF受容体とのキメラ分子の高発現細胞を樹立した。それぞれの細胞をBALB/cの腹腔に免疫した。脾臓を摘出する3日前にAR1HisもしくはAR2Hisを静注した。

〔実施例2〕 scFv提示ライブラリーからの抗体分離

(a) ファージライブラリーのパンニング

10 免疫マウスの脾臓よりpolyA (+) RNAを抽出し、RT-PCRにてscFvを合成し、scFvがf1ファージのgene3との融合蛋白として発現するプラスミドライブラリーを構築した(J. Immun. Methods, 201, (1997), 35-55)。ライブラリーの大腸菌 (2×10^9 cfu) を50 mL 2xYTAG (100 μ g/mLアンピシリン、2%グルコースを含む2xTY) に植菌し、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した。 4×10^{11} のヘルパーファージ

15 VCSM13を加え37℃、15分間静置して感染させた。ここに450 mL 2xYTAG、25 μ L 1mol/L IPTGを添加し、26℃ 10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、100mL PEG-NaCl (10%ポリエチレングリコール8000, 2.5 mol/L NaCl) を混合後、4℃、60分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、沈殿物を40 mLの水に懸濁し、8 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x

20 g、30分間遠心にてファージを沈殿させ5 mL PBSに懸濁した。AR1FLAGとAR2FLAGはNo-Weigh Premeasured NHS-PE04-Biotin Microtubes (Pierce) を用いてビオチン標識した。ファージライブラリーに100 pmolのビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを加え、60分間抗原と接触させた。5% M-PBS (5%スキムミルクを含むPBS) で洗浄したStreptavidin MagneSphere (Promega) 600 μ Lを加え、15分間結

25 合させた。ビーズを1 mLのPBST (0.1% Tween-20を含むPBS) とPBSにて3回ずつ洗浄した。0.8 mLの0.1 mol/L グリシン/HCl (pH2.2) 中にビーズを5分間懸濁し、

- 23 -

ファージを溶出した。回収したファージ溶液に45 μ L 2 mol/L Trisを添加して中和し、対数増殖期 (OD 600 0.4~0.5) XL1-Blue 10 mLに添加、37℃、30分間静置することで感染させた。これを2xYTAGプレートに広げ、30℃で培養した。コロニーを回収し、2xYTAGに植菌、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した。培養液10
5 mLに5 μ L 1mol/L IPTG、 10^{11} pfuヘルパーファージ (VCSM13) を添加し37℃ 30分間静置した。遠心集菌後、25 μ g/mLカナマイシンを含む2xYTAG 100mLに再懸濁し、30℃、10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、20 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、2 mL PBSに懸濁したものを次のパンニングに供した。2回目のパンニングではビーズ
10 をPBSTとPBSにて5回ずつ洗浄した。溶出したファージを感染させ得られた大腸菌からAR結合ファージを産生するクローンをELISAにて選択した。

(b) ファージELISA

上記のシングルコロニーを150 μ L 2xYTAGに植菌し、30℃で一晩培養した。この5 μ Lを500 μ L 2xYTAGに植菌、37℃、2時間培養後、ヘルパーファージ 2.5×10^9 pfuと0.3 μ L 1mol/L IPTGを含む2xYTAGを100 μ L添加し37℃にて30分間静置した。続いて30℃にて一晩培養し、遠心上清をELISAに供した。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) を1.0 μ g/mLビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを含むPBS 100 μ Lにて一晩コートした。PBSTにて洗浄し抗原を除いた後、2 % M-PBS 200 μ Lで一晩ブロッキングした。2 % M-PBSを除き、ここに培養上清を加え40分間静置し抗体を結合させた。洗浄後、結合ファージは2 % M-PBSにて希釈したHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) とBM blue POD基質 (Roche) で検出し、硫酸の添加により反応を停止した後、A450の値を測定した。

(c) 配列決定とクローン選択

ELISAにて陽性であったクローンのファージ液からプライマーPBG3-F1 (5' - CAG CTATGAAATACCTATTGCC -3' /配列番号: 27) とPBG3-R1 (5' - CTTTTCATAATCAAAAT CACCGG -3' /配列番号: 28) を用いてPCRにてscFv領域を増幅し、その塩基配列

- 24 -

決定した。ファージ液1 μ L、10 x KOD Dash緩衝液2 μ L、10 μ mol/Lプライマーを0.5 μ Lづつ、KOD Dashポリメラーゼ (TOYOBO、2.5 U/ μ L) 0.3 μ Lを含むPCR反応液20 μ Lを、Perkin Elmer9700で96℃、10秒、55℃、10秒、72℃、30秒、30サイクルの増幅を行なった。PCR後、5 μ Lの反応液にExoSAP-IT (アマシャム) を3 μ L添加し、37℃、20分間、引き続き80℃、15分間保温した。このサンプルについてPBG3-F2 (5' - ATTGCCTACGGCAGCCGCT -3' / 配列番号: 29) あるいはPBG3-R2 (5' - AAATCACCGGAACCAGAGCC -3' / 配列番号: 30) をプライマーとしてBigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) にて反応を行ない、Applied Biosystems PRISM 3700 DNA Sequencerで泳動した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列のCDR3の異なるクローンを抗AR1及び抗AR2についてそれぞれ45クローンずつ選択した。

〔実施例3〕 二種特異性抗体の発現

scFv-CH1-Fcとして発現させるためにCAGGプロモーターで駆動されるヒトシグナル配列とイントロン-CH1-Fc (ヒトIgG4 cDNA) の間にSfiIサイトを介してscFvを挿入できる発現ベクターpCAGGss-g4CHヘテロIgG4を構築した。ヘテロ分子として発現させるためにIgG1のknobs-into-holes (Protein Engineering vol. 9, 617-621, 1996, Nature Biotechnology vol. 16, 677-681, 1998) を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を作成した。AタイプはY349C、T366Wの置換体である。BタイプはE356C、T366S、L368A、Y407Vの置換体である。両者のヒンジ部分にも置換 (-ppcpScp- → -ppcpPcp-) を導入した。またAタイプにはヒトIL-3のシグナル配列を、BタイプにはヒトIL-6のシグナル配列を用いて構築した (pCAGG-IL3ss-g4CHPa, pCAGG-IL6ss-g4CHPb)。塩基配列より選択したクローンのscFv領域のPCR産物をSfiI処理し、抗AR1クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPaに、抗AR2クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPbにサブクローニングした。抗AR1及び抗AR2クローン45 x 45の合計2025種類の全組み合わせについて発現ベクターをHEK293細胞にリポフェクト

- 25 -

アミン2000を用いてトランスフェクションし、3日後の培養上清を回収した。

〔実施例4〕 アゴニスト二種特異性抗体の分離

(a) BaF3増殖アッセイ

- 5 BaF3-ARGはマウスIL-3依存性増殖細胞BaF3にAR1及びAR2の細胞外領域とG-CSF受容体の細胞内領域とのキメラ分子の発現ベクターを導入して樹立した。BaF3-ARGはIFN α に依存して増殖した。3度洗浄したウエル当り 1×10^3 個の細胞およびサンプルを含む0.1mLの培地で96ウエルプレートに播種した。4日間培養後10 μ Lの生細胞数測定試薬SF (nacalai tesque) を添加し、2時間37 $^{\circ}$ C保温した後A450を測定した。

10 (b) Daudi細胞増殖抑制アッセイ

Daudi細胞はIFNに対して高感受性を示すヒトB細胞株である。サンプルを含む0.1mLの培地でウエル当り 6.25×10^3 個の細胞を96ウエルプレートに播種した。4日間培養後10 μ Lの生細胞数測定試薬SF (nacalai tesque) を添加し、2時間37 $^{\circ}$ C保温した後、A450を測定した。

15 (c) アゴニスト二種特異性抗体の配列

上記スクリーニングにて選択された抗体の可変領域のアミノ酸配列を、配列番号：1～26に示す。各抗体の名称および配列番号との関係は、上記表1に示す。

(d) ISREを用いたレポータージーンアッセイ

- 3 mLのOPTI-MEM Iに100 μ LのDMRIE-C (Invitrogen)を添加し攪拌したものに、
20 pISRE-Lucを40 μ g添加し、攪拌の後室温にて20分間静置した。これを $8 \times 10^6/2$ mL OPTI-MEM Iに調整したヒト細胞K562に加え、37 $^{\circ}$ Cにて4時間培養した後、10 mLの15%FCS-RPMI1640を添加し更に一晚培養した。翌日、遠心操作にて回収したK562を10.5 mLの10%FCS-RPMI1640で再度懸濁し96well平底プレートに70 μ L/wellで播種した。

- 25 抗体遺伝子導入HEK293培養上清中のbispecific scFv-CHをIgG換算で12.5 ng/mLに濃度調整し、更に5倍希釈系列を作製した。これを、レポータープラスミドを導

- 26 -

入した細胞に30 μ L/wellで添加した。陽性対照のwellにはIFN- α 2aの5倍希釈列を30 μ L/well分注した。37℃にて24時間培養後、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) を50 μ L/mL添加し室温10分静置した後、Analyst HT (LJL) にてルシフェラーゼ活性を測定した（図1、図2、図3、図4）。

5

産業上の利用の可能性

本発明によりヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体が提供された。本発明の抗体は、血中での安定性が高く、抗原性もないものと考えられることから、医薬品となるものと大いに期待される。

- 27 -

請求の範囲

1. ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体。
2. 受容体がサイトカイン受容体である請求項 1 に記載の抗体。
- 5 3. サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である請求項 2 に記載の抗体。
4. インターフェロン受容体が I 型インターフェロン受容体である請求項 3 に記載の抗体。
5. I 型インターフェロン受容体が AR1 鎖及び AR2 鎖を含んでいることを特徴とする請求項 4 に記載の抗体。
- 10 6. 受容体が多量体である請求項 1 に記載の抗体。
7. 多量体が二量体である請求項 6 に記載の抗体。
8. 二種特異性抗体である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の抗体。
9. 抗 AR1 鎖抗体の可変領域と、抗 AR2 鎖抗体の可変領域とを含む、請求項 5 に記載の抗体。
- 15 10. 抗 AR1 鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗 AR2 鎖抗体における下記 (b 1) ～ (b 10) のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項 9 に記載の抗体。
 - (a) H 鎖可変領域が配列番号：1 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：2 に記載のアミノ酸配列
 - 20 (b 1) H 鎖可変領域が配列番号：7 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：8 に記載のアミノ酸配列
 - (b 2) H 鎖可変領域が配列番号：9 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：10 に記載のアミノ酸配列
 - (b 3) H 鎖可変領域が配列番号：19 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：20 に記載のアミノ酸配列
 - 25 (b 4) H 鎖可変領域が配列番号：13 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変

- 28 -

領域が配列番号：14に記載のアミノ酸配列

(b5) H鎖可変領域が配列番号：23に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：24に記載のアミノ酸配列

(b6) H鎖可変領域が配列番号：5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：6に記載のアミノ酸配列

(b7) H鎖可変領域が配列番号：17に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：18に記載のアミノ酸配列

(b8) H鎖可変領域が配列番号：15に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：16に記載のアミノ酸配列

(b9) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列

(b10) H鎖可変領域が配列番号：11に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：12に記載のアミノ酸配列

11. 抗AR1鎖抗体における下記(a)のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記(b1)～(b3)のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項9に記載の抗体。

(a) H鎖可変領域が配列番号：3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：4に記載のアミノ酸配列

(b1) H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列

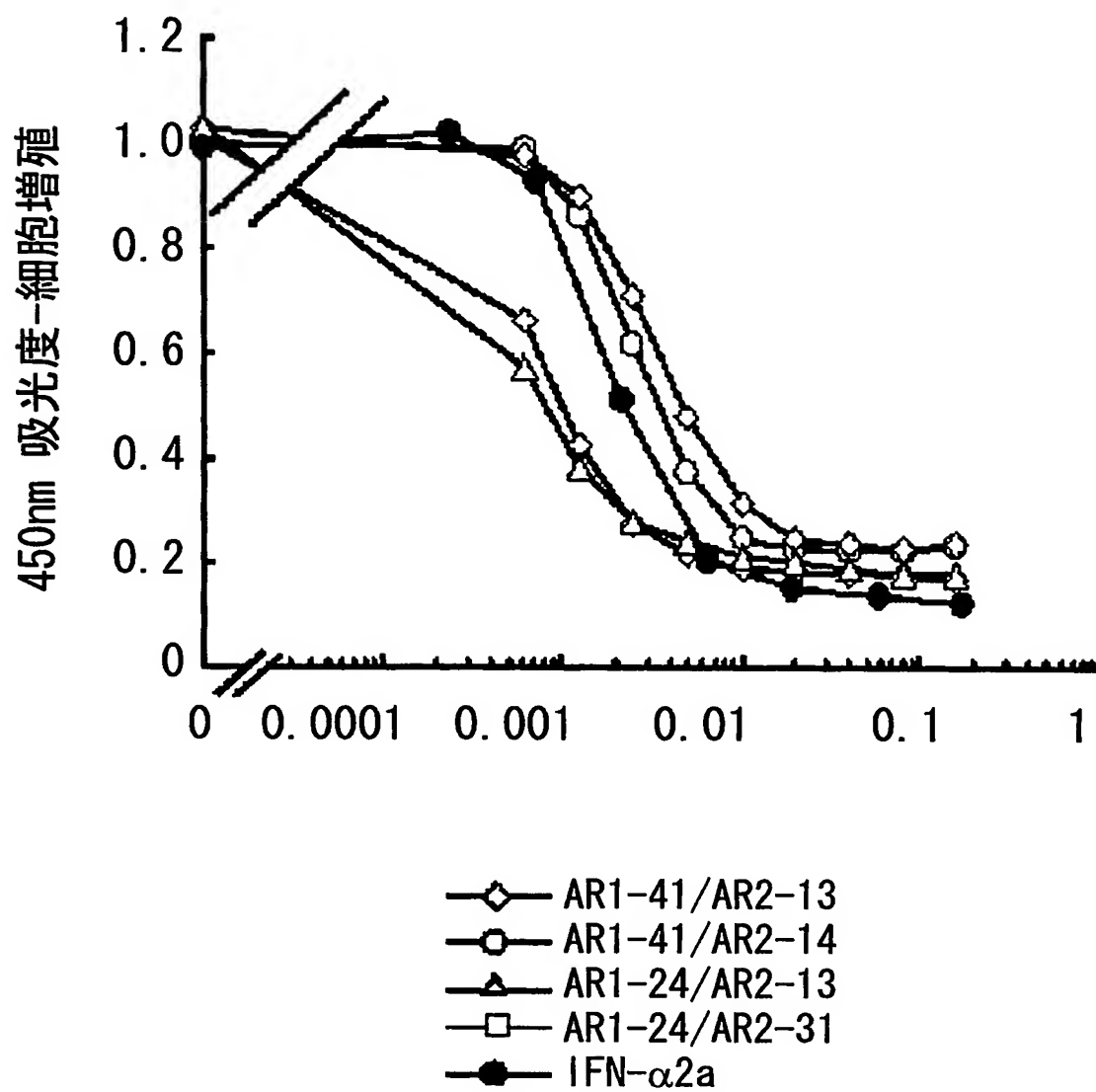
(b2) H鎖可変領域が配列番号：25に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：26に記載のアミノ酸配列

(b3) H鎖可変領域が配列番号：21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：22に記載のアミノ酸配列

12. 請求項1～11のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬組成物。

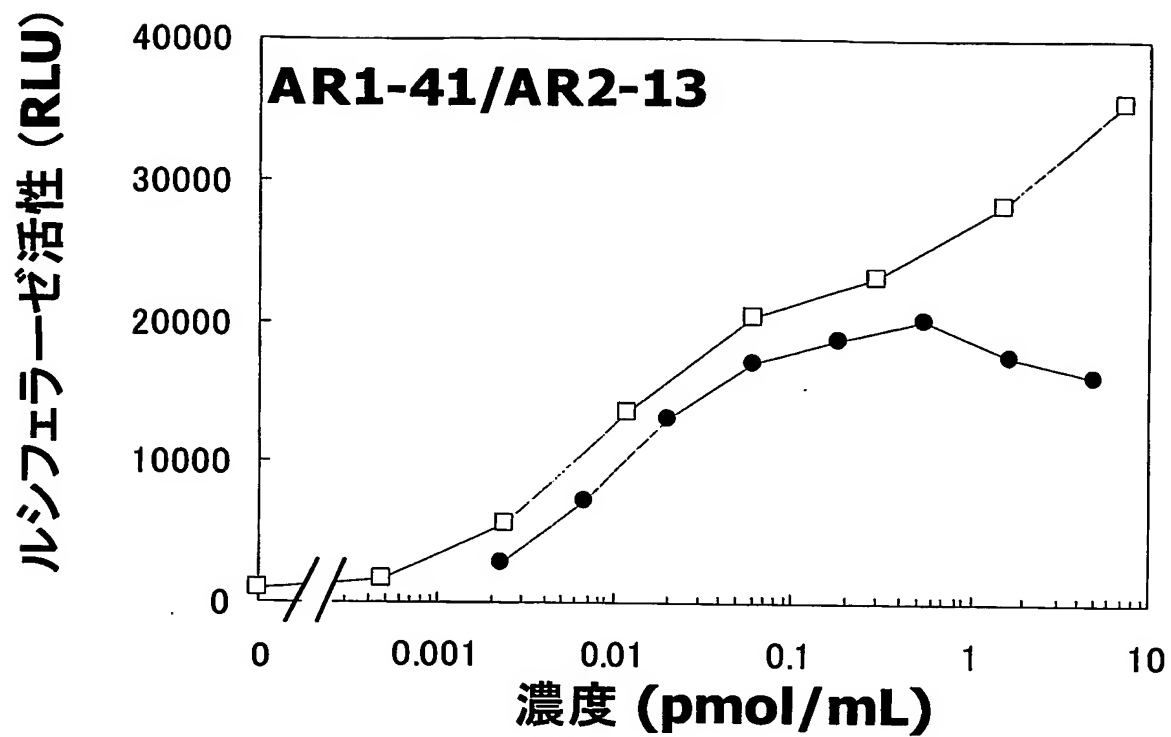
1 / 5

図 1



2 / 5

図 2



3 / 5

図 3

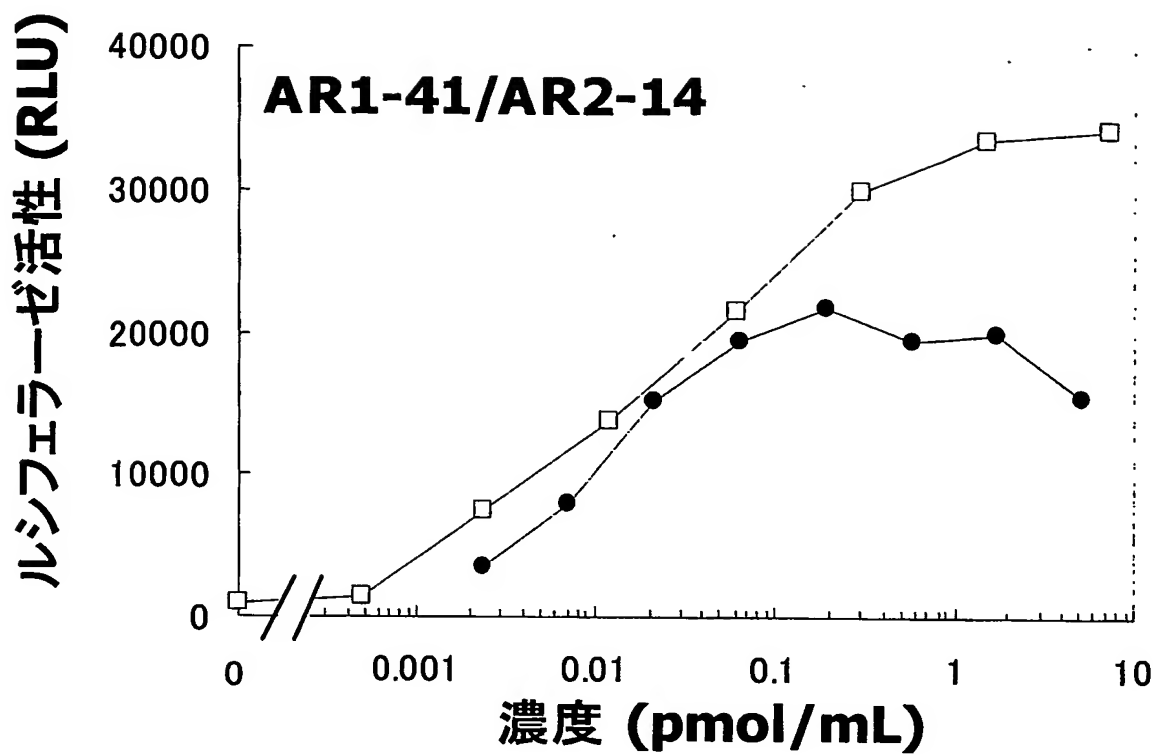


図 4

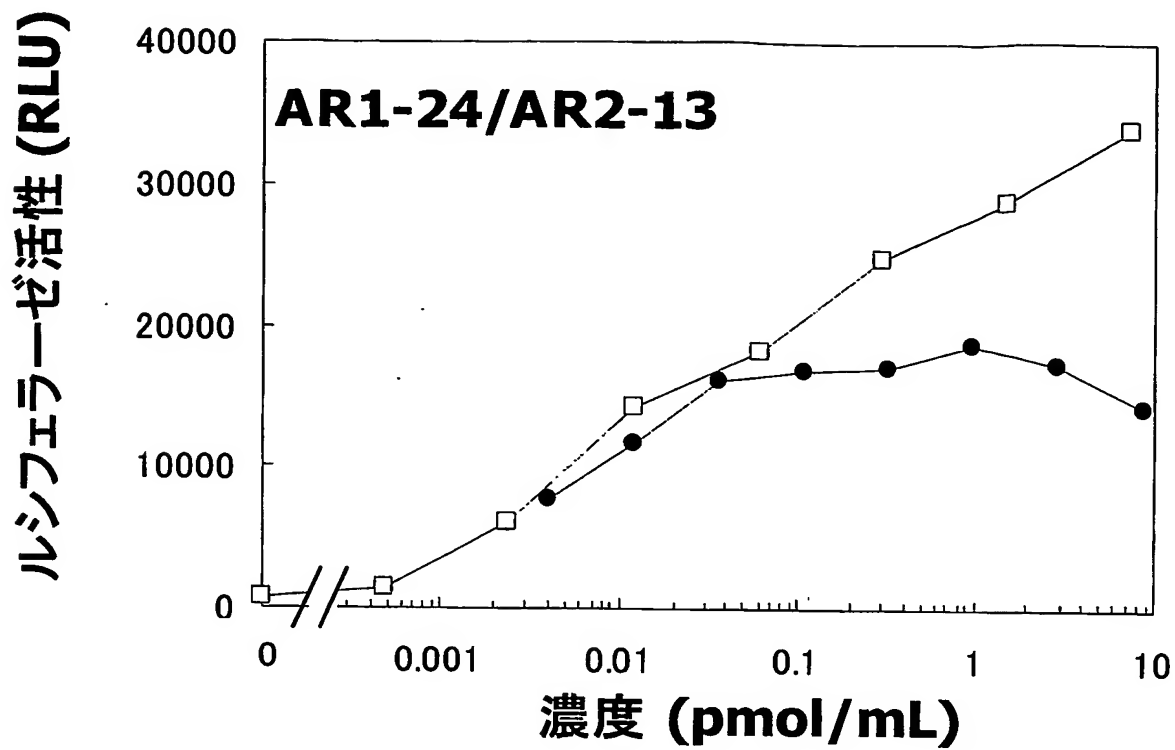
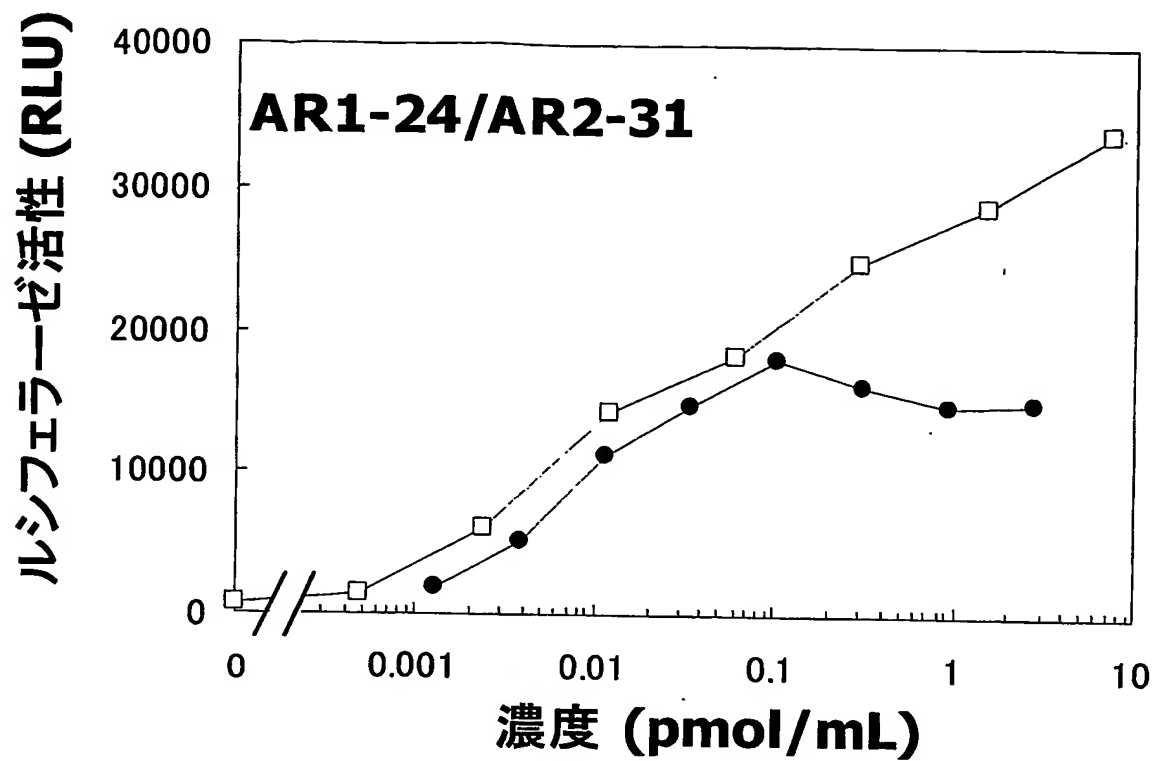


図 5



1 / 2 5

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonist antibodies that bind to hetero receptors

<130> C1-A0228P

<150> JP 2002-377078

<151> 2002-12-26

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Phe Tyr

20

25

30

Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

2 / 2 5

35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Val Tyr Asp Gly His Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

3 / 2 5

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Arg Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Arg Gly Trp Leu Leu Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

4 / 2 5

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65

70

75

80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 5

5 / 2 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Ala Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Gly Thr Tyr Ser Gly Asn Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ala Gly Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

6 / 2 5

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
Lys His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

7 / 2 5

20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ser Lys Ser Ser Lys Asn Leu
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Val Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

8 / 2 5

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile

35

40

45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

9 / 2 5

65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Trp Val Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

1 0 / 2 5

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile

35

40

45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Gly Trp Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Ser Val Thr Val Ser Ser

1 1 / 2 5

115

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg

<210> 13

1 2 / 2 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ala Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Val Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Gly Ser Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

1 3 / 2 5

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1 4 / 2 5

1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Ser Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Val Arg Ser Gly Gly Ser Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

1 5 / 2 5

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

$\langle 210 \rangle$	18
$\langle 211 \rangle$	113
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Mus musculus

```

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
          20          25          30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80

```

1 7 / 2 5

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ile Arg Tyr Asn Gly Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

1 8 / 2 5

100

105

110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85

90

95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

Arg

19 / 25

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Ala Glu Leu Val Arg Pro Glu Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 113

20 / 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
Arg

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

2 1 / 2 5

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Asn Asn
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

2 2 / 2 5

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95
Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

2 3 / 2 5

35 40 45
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

2 4 / 2 5

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

cagctatgaa atacctattg cc

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

2 5 / 2 5

<400> 28

citttcataa tcaaaatcac cgg

23

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

attgcctacg gcagccgct

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 30

aaatcaccgg aaccagagcc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15230.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/28, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/395, A61P31/12, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/28, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/395, A61P31/12, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Francois, C. et al., Construction of a bispecific antibody reacting with the alpha- and beta-chains of the human IL-2 receptor., J.Immunol., Vol.150, No.10, pages 4610 to 4619, (1993)	1,2,6-8,12 3-5,9,12 10,11
X Y A	Lu, D. et al., Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments., J.Immunol.Methods., Vol.267, No.2, pages 213 to 226, (September 2002)	1,2,6-8,12 3-5,9,12 10,11
Y	Kim, S.H. et al., Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNar1 and IFNar2, Gene, Vol.196, No.1-2, pages 279 to 286, (1997)	3-5,9,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
22 December, 2003 (22.12.03)

Date of mailing of the international search report
20 January, 2004 (20.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15230

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Segal, D.M. et al., Introduction: bispecific antibodies., J.Immunol.Methods, Vol.248, No.1-2, pages 1 to 6, (2001)	1-12
A	Carter P., Bispecific human IgG by design., J. Immunol.Methods, Vol.284, No.1-2, pages 7 to 15 (2001)	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K16/28, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/395, A61P31/12, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K16/28, C12N15/09, C12P21/08, A61K39/395, A61P31/12, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus (JOIS)、MEDLINE (STN)、WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Francois, C. et al., Construction of a bispecific antibody reacting with the alpha- and beta-chains of the human IL-2 receptor. J Immunol., Vol. 150, No. 10, pp. 4610-4619 (1993)	1, 2, 6-8, 12 3-5, 9, 12 10, 11
X Y A	Lu, D. et al., Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments. J Immunol Methods, Vol. 267, No. 2, pp. 213-226 (Sep. 2002)	1, 2, 6-8, 12 3-5, 9, 12 10, 11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 12. 03

国際調査報告の発送日

20. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B

8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kim, S. H. et al., Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNaR1 and IFNaR2 Gene, Vol. 196, No. 1-2, pp. 279-286 (1997)	3-5、9、12
A	Segal, D. M. et al., Introduction: bispecific antibodies. J Immunol Methods, Vol. 248, No. 1-2, pp. 1-6 (2001)	1-12
A	Carter P., Bispecific human IgG by design. J Immunol Methods, Vol. 248, No. 1-2. pp. 7-15 (2001)	1-12